

ペルオキシソーム膜蛋白質輸送機構の構造生物学的研究 Structural study for the peroxisomal membrane protein targeting mechanism

丹羽 一

九州大学大学院理学研究院生命科学部門, 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Hajime Niwa

Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University Graduate School,
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581, Japan

1 はじめに

ペルオキシソームは真核生物に普遍的に存在する細胞内小器官で、極長鎖脂肪酸の β 酸化をはじめ、生体に不可欠な多くの代謝機能を担っている。ペルオキシソーム形成不全は Zellweger 症候群のような重篤な神経疾患を引き起こすことが知られており、これまでヒトではペルオキシソーム形成必須蛋白質（ペルオキシシン、Pex）が 14 種同定されている [1]。そのうち 9 種までがペルオキシソーム膜上に局在する膜蛋白質で、ペルオキシソーム膜蛋白質（Peroxisomal Membrane Protein、以後 PMP と略）のペルオキシソームへの局在制御は非常に重要である。

PMP は細胞質で合成され、シャペロン機能を持った Pex19p と結合し、ペルオキシソームへと運ばれる。それぞれ PMP には 1 つまたは 2 つの Pex19p 結合領域があり（その多くは膜貫通領域にある）、PMP と結合した Pex19p は、ペルオキシソーム膜上のペルオキシシン Pex3p を標的にペルオキシソームに移行する。これまで Pex19p の N 末ペプチドと Pex3p 細胞質領域との共結晶構造が報告されており、Pex19p の N 末領域が Pex3p と相互作用することが分かっている。しかし PMP のペルオキシソームへの移行には、Pex19p-PMP がペルオキシソーム膜上の Pex3p と相互作用するだけでは十分ではない。PMP には、Pex19p 結合部位以外にペルオキシソーム局在に重要な配列があることが分かっている。例えば Pex11p では、N 末 180 アミノ酸を欠失してもペルオキシソームに限定局在出来るが、N 末 210 アミノ酸を欠くとペルオキシソームへの局在の特異性が失われ、ミトコンドリアにも誤局在してしまうようになる。N 末 210 アミノ酸欠損でも、Pex19p 結合部位を含み、Pex19p とは安定な複合体を形成できるので、Pex19p との複合体形成だけではペルオキシソームへの限定局在に十分でないことがわかる。また Pex14p は、Pex19p と安定な複合体を形成するにも関わらず、ペルオキシソームに局在出来なくなる欠損変異があることが我々の研究からわかった。更に Pex16p は Pex19p-Pex3p の相互作用なしで膜に挿入されるなど、Pex19p を介した PMP 膜挿入メカニズムは単純ではない。

これまで Pex19p-C ドメインの結晶構造は報告されているが、PMP 結合には Pex19p 全長が必要な場合が多く、全長構造解析は重要である。だが Pex19p-N 末領域は、その配列やこれまでの生化学的な研究結果から、単独では本来、安定な構造を持たない Intrinsic Disordered Protein である可能性が考えられ、単独での結晶化は非常に困難である。

そこで我々はヒト Pex19p 全長の構造解析を目指し、Pex19p-N 末領域が安定化する複合体を精製、結晶化を進めている。

2 実験

2-1) Pex14p 蛋白質の発現、精製

Pex3p-細胞質領域、Pex11p、Pex14p、Pex16p を Pex19p との複合体パートナーとして精製した。これらの大腸菌発現系は、それぞれ pCold1 ベクターに、PCR で増幅させた Pex 遺伝子断片を挿入し、これを大腸菌 Rosetta2 (DE3) に形質転換して構築した。終濃度 0.1 mM IPTG で発現誘導し、15°C、24 時間培養し、集菌。Pex3p の場合、N 末端の膜貫通領域を削った細胞質領域は可溶性であるので、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 M NaCl で細胞を懸濁、超音波破碎後、遠心し、上清を Ni アフィニティーカラムにかけ、500 mM イミダゾールで溶出させた。これを更にゲル濾過 (superdex200) に通し、分子量的に均一の試料を得た。その他の Pex は膜貫通領域を含むため、0.1 % n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) または 0.8 % n-octyl- β -D-glucoside (OG) を含む buffer を用いて、上記 Pex3p と同様に精製した。最終試料の組成は 20 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl、0.1 mM DTT、(0.1 % DDM or 0.8 % OG)。

2-2) ゲル濾過での Pex19p-PMP 複合体の精製

上記のように精製した Pex19p、Pex14p を混合し、ゲル濾過 (superdex200) したところ、安定な複合体を精製することが出来た。Pex19p は溶液中、単量体 (32KD) で存在しているが、ゲル濾過では 90KD の挙動を示し [2]、Pex14p は 0.8 % OG を含む buffer 中、200KD ほどの複合体となっている。これは分子量から 4-5 量体程度だと考えられる。両者を混合し、0.8 % OG を含む buffer でゲル濾過したところ、600-700KD 程度の Pex19p、Pex14p を含む複合体が検

出された。SDS-PAGE で、両者はほぼ 1:1 の存在比であり、4-5 量体の Pex14p のホモ複合体に Pex19p が 4-5 分子結合したと仮定すると、ゲル濾過で検出された複合体分子量とよく一致する。

3 結果および考察

蛋白質とリザーバー溶液を等量混合し、ハンギングドロップによる蒸気拡散法で Pex19p/Pex14p 安定複合体の結晶化を行ったが、現在まで有望な結晶は得られていない。膜蛋白質である Pex14p の可溶化には界面活性剤が必須であるが、この Pex19p/Pex14p は界面活性剤非存在下でゲル濾過しても、その挙動が変わらない。このことは、Pex19p がペルオキシソーム膜蛋白質 (PMP) シャペロンとしてよく機能しており、Pex14p の膜貫通領域を覆うように水性環境から保護していることを示している。この界面活性剤を除去した条件での結晶化も進めている。

また Pex14p の C 末 Truncation シリーズを作り、上記と同様にして、精製し、Pex19p との複合体形成能をゲル濾過でみた。作成した Truncation は 1-106aa、1-140aa、1-230aa の 3 種で、106aa までは膜貫通領域を含まない細胞質領域だけであるが、この領域だけでも Pex19p と安定な複合体が検出出来た。Pex14p の Pex19p 結合部位は膜貫通領域にあると考えられていることから、この相互作用は Pex19p がシャペロンとしてではなく、別の機能による結合と考えられる。Pex14p はペルオキシソームマトリックス蛋白質を運ぶ Pex5p の膜上標的因子、受容体として機能しているが、この Pex19p が Pex14p と相互作用する部位は、Pex5p が Pex14p と相互作用する部位と同じで、Pex19p と Pex5p は Pex14p に対して拮抗することが知られている。つまり、この Pex14p(1-106aa) と Pex19p の安定複合体は、この相互作用を通じて結合した複合体だと考えられる。このとき SDS-PAGE の両者のバンドの濃度比から、1 対 1 の比で結合する。これらの Pex14p-C 末 Truncation と Pex19p との安定複合体の結晶化も進めているが、現在まで有望な結晶は得られていない。

Pex19p-N 末の構造的な不安定性が大きく影響しているのではないかと考えられるが、MBP 融合による N 末領域の安定化 Pex19p での結晶化においても未だ有望な結晶は得られていない。

今後、全長 Pex14p/Pex19p 複合体の結晶化条件の検討を行うと同時に AFM 観察も行っていく。

参考文献

- [1] Fujiki, Y. (2011) *Encyclopedia of Life Sciences* pp1-9
- [2] Sato et al., (2008) *J. Biol. Cell* 283 pp6136-44

謝辞

PF のすべてのスタッフの方々に、特に NW12A のラインマネージャーである山田悠介氏には大変お世話になりました。ここに感謝致します。

email address: haji.niwa@gmail.com